

论著·实验研究

# Resistin 基因对胰岛 $\beta$ 细胞 RINm5F 增殖的影响

刘峰<sup>1</sup> 邱洁<sup>2</sup> 张春梅<sup>2</sup> 季晨博<sup>2</sup> 郭锡熔<sup>2</sup>

(1. 南京医科大学附属南京儿童医院呼吸科, 江苏 南京 210029; 2. 南京医科大学儿科研究所, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** **目的** Resistin 被认为是联系肥胖与 2 型糖尿病的脂肪因子。本研究旨在探讨 resistin 基因过表达对胰岛  $\beta$  细胞株 RINm5F 增殖的影响。**方法** 体外培养 RINm5F 大鼠胰岛  $\beta$  细胞, 通过 pcDNA3.1-resistin 真核表达质粒转染 RINm5F 细胞, 筛选稳定表达株。采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法检测细胞增殖, 采用 RT-PCR 法验证 Resistin mRNA 水平及检测 SOCS-3 的 mRNA 水平, Western blot 法检测 Akt 的总蛋白和磷酸化水平。**结果** 过表达 resistin 的 RINm5F 细胞增殖速度显著低于正常对照组 ( $P < 0.05$ )。过表达 resistin 的 RINm5F 细胞中 Akt 磷酸化水平为正常对照组的 0.6 倍 ( $P < 0.05$ ), 而 SOCS-3 mRNA 水平为正常对照组的 3.2 倍 ( $P < 0.05$ )。**结论** Resistin 基因过表达减缓了胰岛  $\beta$  细胞 RINm5F 的增殖, 其机制可能与上调了 SOCS-3 从而导致 Akt 下调有关。

[中国当代儿科杂志, 2010, 12(1): 43-46]

**[关键词]** Resistin; 增殖; 胰岛  $\beta$  细胞

**[中图分类号]** R394-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)01-0043-04

## Resistin inhibits rat insulinoma cell RINm5F proliferation

LIU Feng, QIU Jie, ZHANG Chun-Mei, JI Chen-Bo, GUO Xi-Rong. Department of Respiratory Medicine, Nanjing Children's Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China (Guo X-R, Email: xrguo@njmu.edu.cn)

**Abstract: Objective** Resistin was thought to link the obesity to type 2 diabetes. This study aimed to investigate the effect of resistin on insulinoma cell proliferation. **Methods** pcDNA3.1-resistin was transfected into rat insulinoma cells RINm5F. Cell proliferation was assessed by the MTT assay. The resistin and SOCS3 mRNA levels were assessed by RT-PCR. The total Akt level and the phosphorylation status were assessed by Western blot. **Results** The over-expressed resistin inhibited the RINm5F cell proliferation ( $P < 0.05$ ). SOCS-3 expression was up-regulated by resistin over-expression (3.2 folds over the control;  $P < 0.05$ ). Akt phosphorylation was down-regulated by resistin over-expression (0.6 fold over the control;  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Resistin impairs the rat insulinoma cell RINm5F proliferation. This might be attributed to a down-regulation of Akt level caused by increased SOCS-3 expression.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(1): 43-46]

**Key words:** Resistin; Proliferation; Insulinoma cell

胰岛  $\beta$  细胞功能障碍是 2 型糖尿病的重要病理生理变化, 胰岛  $\beta$  细胞增殖减缓是其功能障碍的重要原因<sup>[1]</sup>。各种因素均可导致胰岛  $\beta$  细胞的增殖速度减缓, 如缺氧、细胞因子变化等<sup>[2]</sup>。Resistin 是一个脂源性细胞因子, 由于近年来发现 resistin 在胰岛中也有一定量的表达, 提示它可能参与胰岛  $\beta$  细胞功能的调节<sup>[3]</sup>。已发现 resistin 能抑制胰岛  $\beta$  细胞中的胰岛素受体后信号转导通路, 并引发胰岛  $\beta$  细胞的胰岛素抵抗, 从而提示 resistin 这一脂源性细胞因子也可能是胰岛  $\beta$  细胞功能的重要调节因子之一<sup>[4]</sup>。在胰岛  $\beta$  细胞的功能研究中, 因为原代

培养难度大, 大鼠胰岛  $\beta$  细胞株 (RINm5F) 广泛运用于胰岛  $\beta$  细胞的研究。RINm5F 细胞被证实是研究  $\beta$  细胞增殖、凋亡及胞内信号转导的首选细胞株<sup>[5]</sup>。细胞因子信号蛋白 (SOCS-3) 是参与胰岛素信号转导途径调节的一个重要信号分子, 可抑制 IRS (胰岛素受体底物) 蛋白中酪氨酸位点的磷酸化而调节胰岛素所产生的生物学效应。研究证实 SOCS-3 和胰岛  $\beta$  细胞的增殖、凋亡密切相关, SOCS-3 激活将导致  $\beta$  细胞增殖减慢、凋亡增加<sup>[4]</sup>。本研究旨在探讨 resistin 基因过表达对胰岛  $\beta$  细胞增殖的影响。本研究以 RINm5F 为研究对象, 通过 pc-

[收稿日期] 2009-03-11; [修回日期] 2009-05-04

[基金项目] 国家自然科学基金 (30371502, 30571978); 江苏省自然科学基金 (BK2001120)。

[作者简介] 刘峰, 男, 博士, 医师。

[通信作者] 郭锡熔, 教授。

DNA3.1-resistin 真核表达质粒转染 RINm5F 细胞,观察胰岛  $\beta$  细胞增殖的变化,评价 resistin 对胰岛  $\beta$  细胞增殖的影响。同时检测了 SOCS-3 的 mRNA 的表达变化,和 Akt 总蛋白和磷酸化水平的变化,初步探讨 resistin 与 RINm5F 细胞增殖的关系。

# 1 方法

## 1.1 RINm5F 的培养

RINm5F 由南京医科大学韩晓教授馈赠,采用 1640 培养基(Gibco, Inc.)加 10% 胎牛血清(Gibco, Inc.),在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,每 2 天换液 1 次。实验分组:对照组为未转染的 RINm5F 细胞;空载组为转染 pcDNA3.1B 空载质粒的 RINm5F 细胞;resistin 转染组为转染 pcDNA3.1B-resistin 质粒的 RINm5F 细胞。

## 1.2 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞增殖

将 RINm5F 均匀接种于 96 孔板中,待到检测时间点,换用无血清培养基,每孔加入 MTT 10  $\mu$ L (5 mg/mL),轻轻摇匀,37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下继续孵育 4 h。弃去含 MTT 的培养液,用生理盐水轻柔洗一遍,倒干液体,每孔加入 40  $\mu$ L 溶解剂(DMSO),轻轻摇匀,室温孵育 10 min。用 ELISA 仪测定波长为 540 nm 时的吸光度,以反映细胞增殖状况。

## 1.3 Resistin 基因过表达 RINm5F 的获得

Trizol 一步法提取大鼠脂肪组织 mRNA,采用 RT-PCR 法扩增大鼠 resistin 基因全编码区 cDNA 片段,所用引物序列如下。

上游引物含 BamH 酶切位点:5-GCA GGA TCC ATG AAG AAC CTT TCA T-3;下游含 Xho 酶切位点:5-TAT CTC GAG CGG GAA CCA ACC CGC-3,产物大小 362 bp,PCR 产物纯化回收后,BamH 和 Xho 双酶切后,T4 连接酶连接,插入 pcDNA3.1B 表达载体。转化 JM109 感受态大肠杆菌后挑单克隆测序鉴定,测序验证正确。

去内毒素抽提 pcDNA3.1B-resistin,在 RINm5F 细胞融合度 70%,无血清培养基饥饿过夜。pcDNA3.1B-resistin 质粒与 Fugen6 脂质体预混的液体加入 RINm5F 培养上清。12 h 后换液,并加入 G418 筛选稳定表达细胞株。RT-PCR 验证 resistin mRNA 水平,冻存鉴定正确细胞株。

## 1.4 RT-PCR 检测 resistin 和 SOCS3 mRNA 的表达

Trizol 一步法提取 RINm5F 细胞的总 RNA,经电泳验证,测定 A260/A280 比值 > 1.8。定量后取总

RNA 1  $\mu$ g,以 Oligo (dT) 15 为引物进行逆转录反应。取逆转录产物 1  $\mu$ L 为模板进行 PCR 扩增 58℃ 退火。所用引物及 PCR 反应如下。

Resistin:正向 5'-CCC ATG GAT GAA GCC ATC AGC 3',反向 5'-GTC CCA TGA GCC ACA GCC AG-3',产物大小 180 bp,30 个循环;SOCS3:正向 5'-CAC AGC AAG TTT CCC GCC GCC-3',反向 5'-GTG CAC CAG CTT GAG TAC ACA-3',产物大小 366 bp,30 个循环; $\beta$ -actin:正向 5'-TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3',反向 5'-CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC-3',产物大小 240 bp,28 个循环。

所选用 PCR 反应的模板量及循环数均使 PCR 产物量位于反应曲线的线性范围内。PCR 产物电泳后,以 UVP 凝胶密度扫描仪对各基因和  $\beta$ -actin 基因特异性扩增产物的电泳条带进行密度扫描,用 Labwork 3.0 软件分析电泳条带密度值。

## 1.5 Western blot 法检测 Akt 总蛋白水平和磷酸化水平

总蛋白、磷酸化蛋白提取及 Western blot 法检测参照文献<sup>[6]</sup>。PBS 洗涤细胞 2 次,收集细胞,加入冰预冷的裂解液(含蛋白酶抑制剂 cocktail)并置于冰上裂解、离心,收集上清液(同时测定上清蛋白水平)。上清液于 100℃ 煮沸变性、等量蛋白上样。10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAG)电泳后,转膜。3% BSA 室温封闭 2 h 后,加入 Akt 和 p-Akt 抗体(1:1 000) 4℃ 孵育过夜。TBST(PBS 加 0.1% Tween 20)洗膜。加过氧化物酶标记的二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,洗膜。ECL 法(增强化学发光)检测并用 Labwork 3.0 软件测定密度值。

## 1.6 统计学分析方法

数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,并采用 SPSS 11.0 统计软件进行数据整理和统计。两小样本均数之间的比较,经方差齐性分析  $F$  检验后,选择  $t$  或  $t'$  检验。 $P < 0.05$  示差异有显著性。

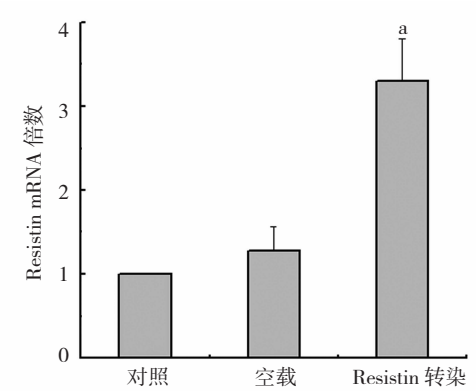
# 2 结果

## 2.1 Resistin 过表达的鉴定

在转染空载的 RINm5F 细胞中有少量的 Resistin 表达,而转染有 pcDNA3.1-resistin 的 RINm5F 细胞 resistin mRNA 是转染空载的 3.5 倍,证实本过表达 resistin 的 RINm5F 细胞筛选有效,见图 1。

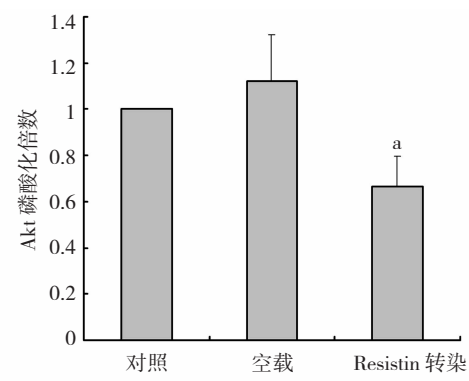
## 2.2 RINm5F 的增殖

在过表达 resistin 的 RINm5F 中,其增殖率显著下降,见图 2。

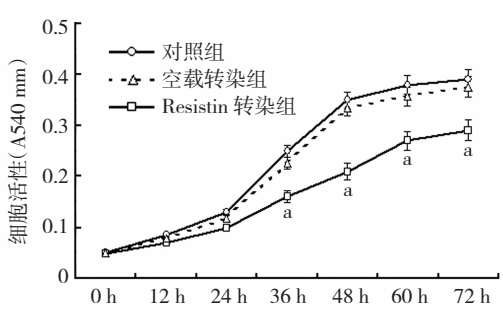


**图1 Resistin mRNA 表达** 转染 pcDNA3.1-resistin 质粒的细胞的 resistin mRNA 表达量显著高于转染空载质粒。a:与空载组比较, $P<0.05$

水平显著低于正常对照组,而 Akt 的总蛋白水平无变化,见图4。



**图4 Akt 的磷酸化水平** Resistin 过表达下调了 Akt 的磷酸化水平。a:与空载组比较, $P<0.05$ 。



**图2 RINm5F 的增殖** Resistin 过表达下调了 RINm5F 的增殖。a:与空载组比较, $P<0.05$

### 3 讨论

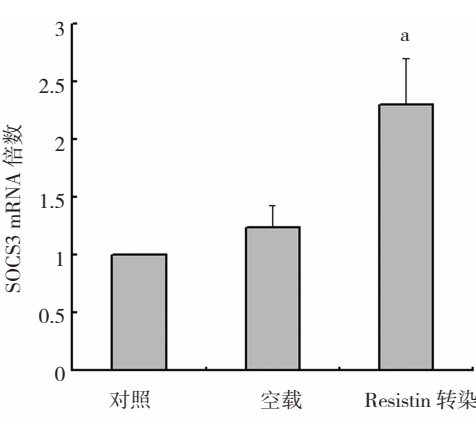
#### 2.3 SOCS-3 的 mRNA 水平

在脂肪细胞和肝脏中 resistin 引起胰岛素抵抗是通过激活 SOCS-3 实现的。在过表达 resistin 的 RINm5F 中,SOCS-3 的 mRNA 水平高于空载转染组,见图3。

胰岛  $\beta$  细胞功能障碍是 2 型糖尿病重要病理生理变化。在 2 型糖尿病发病前,机体出现胰岛素抵抗,此与糖原代谢密切相关<sup>[7]</sup>。胰岛  $\beta$  细胞功能代偿使血糖维持在正常水平;而当胰岛素  $\beta$  细胞功能出现障碍后,机体将出现难治性的高糖血症。胰岛  $\beta$  细胞增殖减缓或增殖障碍是胰岛  $\beta$  细胞功能障碍的重要原因<sup>[8]</sup>。目前关于脂源性细胞因子与胰岛  $\beta$  细胞功能的关系日益受到学者们的重视。

Resistin 是由 Stepan 等<sup>[9]</sup>于 2001 年在小鼠脂肪组织中所发现的新脂源性细胞因子。研究发现,在 resistin 转基因鼠中,发生了胰岛素刺激的葡萄糖转运障碍<sup>[10]</sup>。在细胞水平的研究显示,resistin 能诱导骨骼肌、肝脏和脂肪细胞的胰岛素抵抗<sup>[11-13]</sup>。在 resistin 与胰岛  $\beta$  细胞关系的研究中发现, resistin 在胰岛中也有一定量的表达<sup>[3]</sup>; resistin 能抑制胰岛  $\beta$  细胞中的胰岛素受体后信号转导通路,并引发胰岛素抵抗<sup>[14]</sup>;在 resistin 干预下的胰岛  $\beta$  细胞葡萄糖刺激的胰岛素释放 GSIS 功能显著降低<sup>[4]</sup>。

为进一步研究 resistin 与胰岛  $\beta$  细胞增殖的关系,本研究采用 pcDNA 3.1-resistin 质粒转染 RINm5F 细胞,G418 筛选稳定表达株。因现有的 resistin 抗体效价都偏低,故使用 RT-PCR 法从 mRNA 水平验证转染效率。发现 resistin 过表达显著下调了 RINm5F 细胞的增殖。先前的研究发现, resistin 能诱导胰岛素靶器官:骨骼肌、肝脏、脂肪的胰岛素抵抗。本研究证实, resistin 还影响胰岛  $\beta$  细胞的增殖,这可能是 resistin 参与了 2 型糖尿病发病的另一机制。



**图3 SOCS3 mRNA 水平** Resistin 过表达上调了 SOCS3 的 mRNA 水平。a:与空载组比较, $P<0.05$

#### 2.4 Akt 的磷酸化水平

在过表达 resistin 的 RINm5F 中,Akt 的磷酸化

本研究发现, resistin 能显著上调胰岛  $\beta$  细胞 SOCS-3 的 mRNA 水平。研究显示 resistin 诱导脂肪细胞和肝脏的胰岛素抵抗主要是通过激活 SOCS-3 来实现的。在胰岛靶器官, 如脂肪细胞和肝细胞中, SOCS3 的激活主要会诱导细胞内胰岛素信号转导通路的下调表现为脂肪细胞摄取糖和肝细胞合成糖原能力的下调<sup>[12, 15]</sup>。而在胰岛  $\beta$  细胞中, SOCS-3 的激活将会下调胰岛素信号转导通路, 显著下调 Akt 的活性, 对胰岛  $\beta$  细胞的存活和增殖产生影响<sup>[16]</sup>。

随后的研究发现, resistin 能显著下调胰岛  $\beta$  细胞 Akt 的磷酸化水平, Akt 的活性(磷酸化调节)是胰岛  $\beta$  细胞存活和增殖调节的中心靶标<sup>[16]</sup>。Akt 活性受抑制, 胰岛  $\beta$  细胞将易受损伤因素的影响, 同时增殖能力减弱; 而 Akt 的激活能保护胰岛  $\beta$  细胞免受损伤因素的影响, 同时增殖能力增强<sup>[16]</sup>。

综上所述, 过表达 resistin 能下调 RINm5F 细胞的增殖。其机制可能与 resistin 激活 SOCS-3 及其抑制 Akt 的磷酸化有关。

[参 考 文 献]

[1] Cao X, Yang J, Burkhardt BR, Gao Z, Wong RK, Greene SR, et al. Effects of overexpression of pancreatic derived factor (FAM3B) in isolated mouse islets and insulin-secreting betaTC3 cells[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005, 289(4):E543-550.

[2] Wang N, Xu X, Zou H, Zhu J, Wang W, Ho PC. The status of diabetic retinopathy and diabetic macular edema in patients with type 2 diabetes: a survey from Beixinjing District of Shanghai City in China[J]. Ophthalmologica, 2008, 222(1):32-36.

[3] Minn AH, Patterson NB, Pack S, Hoffmann SC, Gavrilova O, Vinson C, et al. Resistin is expressed in pancreatic islets[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 310(2):641-645.

[4] Nakata M, Okada T, Ozawa K, Yada T. Resistin induces insulin resistance in pancreatic islets to impair glucose-induced insulin release[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353(4):1046-1051.

[5] Kim EK, Kwon KB, Han MJ, Song MY, Lee JH, Lv N, et al. Inhibitory effect of Artemisia capillaris extract on cytokine-induced nitric oxide formation and cytotoxicity of RINm5F cells[J]. Int J Mol Med, 2007, 19(3):535-540.

[6] Liu F, Guo XR, Gong HX, Ni YH, Fei L, Pan XQ, et al. A resistin binding peptide selected by phage display inhibits 3T3-L1 preadipocyte differentiation[J]. Chin Med J, 2006, 119(6):496-503.

[7] 刘晓梅, 卢岩, 潘莉莉, 李书琴. 宫内生长受限大鼠肝脏糖异生酶的表达增加与胰岛素抵抗[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(2):216-220.

[8] Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jorns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities[J]. Diabetes, 2005, 54(Suppl 2):S97-107.

[9] Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes[J]. Nature, 2001, 409(6818):307-312.

[10] Satoh H, Nguyen MT, Miles PD, Imamura T, Usui I, Olefsky JM. Adenovirus-mediated chronic "hyper-resistinemia" leads to in vivo insulin resistance in normal rats[J]. J Clin Invest, 2004, 114(2):224-231.

[11] Fan HQ, Gu N, Liu F, Fei L, Pan XQ, Guo M, et al. Prolonged exposure to resistin inhibits glucose uptake in rat skeletal muscles[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(3):410-416.

[12] Liu F, Yang T, Wang B, Zhang M, Gu N, Qiu J, et al. Resistin induces insulin resistance, but does not affect glucose output in rat-derived hepatocytes[J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(1):98-104.

[13] Liu F, Fan HQ, Qiu J, Wang B, Zhang M, Gu N, et al. A paradox: insulin inhibits expression and secretion of resistin which induces insulin resistance[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(1):95-100.

[14] Brown JE, Onyango DJ, Dunmore SJ. Resistin down-regulates insulin receptor expression, and modulates cell viability in rodent pancreatic beta-cells[J]. FEBS letters, 2007, 581(17):3273-3276.

[15] Steppan CM, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ, Lazar MA. Activation of SOCS-3 by resistin[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(4):1569-1575.

[16] Dickson LM, Rhodes CJ. Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? [J]. Am J Physiol, 2004, 287(2):E192-198.

(本文编辑:徐福兰)

• 消息 •

全国第八届儿童发育和早产儿优化发展临床学术研讨会  
暨学习班征文通知

儿童早期发展和早产儿等高危新生儿早期干预涉及多学科合作,为了把这些交叉学科及专业的科研成果让大家共享,由中国优生优育协会、中华预防医学会主办的全国第八届儿童发育和早产儿优化发展临床学术研讨会暨学习班定于2010年7月16日至20日在北京召开。会间将邀请国内外著名的围产医学、儿童早期干预、儿科临床、儿童保健、小儿眼科、康复医学等方面的专家做专题报告,并授予国家级医学继续教育学分。会议征文可为涉及儿童早期发展、高危儿早期干预基础、临床、营养、保健、管理、康复、心理、教育等各方面内容的论文。稿件寄至北京市宣武区清芷园11号楼B座105号宝篮贝贝儿童早期发展中心,鲍秀兰、孙淑英收。邮编:100054。联系电话:01063528545;或投稿至baoxl@163bj.com。截稿日期:2010年5月15日。